



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MARIANA OLIVEIRA DUARTE

**SEMENTES ABORTADAS OU ÓVULOS NÃO
FECUNDADOS?**

**INVESTIGAÇÃO DA POSSÍVEL OCORRÊNCIA DE DOIS SÍTIOS
DE AUTOINCOMPATIBILIDADE EM *ACIANTHERA*
(ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal.

BELO HORIZONTE – MG

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MARIANA OLIVEIRA DUARTE

**SEMENTES ABORTADAS OU ÓVULOS NÃO
FECUNDADOS?**

**INVESTIGAÇÃO DA POSSÍVEL OCORRÊNCIA DE DOIS
SÍTIOS DE AUTOINCOMPATIBILIDADE EM *ACIANTHERA*
(ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Maria Trombert Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE – MG

2020

043

Duarte, Mariana Oliveira.

Sementes abortadas ou óvulos não fecundados? Investigação da possível ocorrência de dois sítios de autoincompatibilidade em *Acianthera* (Orchidaceae) [manuscrito] / Mariana Oliveira Duarte. – 2020.

76 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba. Coorientadora: Profa. Dra. Denise Maria Trombert Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Morfologia vegetal. 2. Autoincompatibilidade em Angiospermas. 3. Tubo Polínico. I. Borba, Eduardo Leite. II. Oliveira, Denise Maria Trombert. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



UFMG

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
Universidade Federal de Minas Gerais
ICB - Departamento de Botânica

Tese defendida por Mariana Oliveira Duarte em 28 de fevereiro de 2020 e aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Dr. Eduardo Leite Borba (UFMG)

Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer (Universidade Estadual de Campinas)

Dra. Ana Paula de Souza Caetano (Universidade Federal de Mato Grosso)

Dra. Karina Proite (Pós doutora pela UFMG)

Dr. Adriano Valentin da Silva (Pós doutorando pela UFMG)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFMG, pela infraestrutura e apoio no desenvolvimento da tese.

À CAPES, pela bolsa concedida e ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa (processo 430515/2016-2).

Ao meu orientador, prof. Dr. Eduardo L. Borba, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela confiança. Muito obrigada por todos os ensinamentos e valiosas discussões durante esses anos e, principalmente, por ter feito parte da minha formação acadêmica.

À minha coorientadora, profa. Dra. Denise M. T. Oliveira, por aceitar a parceria neste trabalho, por todo aprendizado, amizade e paciência. Agradeço as valiosas contribuições neste trabalho e na minha formação acadêmica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, pelo apoio técnico e de infraestrutura na realização das análises ultraestruturais.

Ao Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG, pelo empréstimo das coleções, e à Jacqueline Rodrigues, pelo auxílio e suporte.

Ao Instituto Estadual de Florestas, pela autorização das coletas (059/2018).

Aos membros da banca examinadora, por terem aceito o convite para colaborar com este trabalho.

À Cecília Fiorini e à Gabriela Lustre, pela amizade, companhia e ajuda no campo.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Botânica, especialmente aos professores Dr. Élder Paiva e Dr. João Batista, por todo aprendizado e exemplo de profissionalismo.

À Diana Sampaio e à Mariana Alves, amigas que me incentivaram a continuar na área acadêmica.

Aos amigos do Laboratório PlantSer: Adriano, Andrea, Camila, Carol, Gabriel,

Igor, Stéphanie e Victor, por terem me recebido com muito carinho e pela ótima convivência nesses quatro anos. Agradeço também aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal e de Sistemática Vegetal.

Aos amigos que fiz durante esse tempo em Belo Horizonte: Alberto, Alexandre, Cecília, David, Stéphanie, Daniela, Elaine, Gabriel, Igor, Ingrid, Jenny e Vagner, pela amizade e carinho. Em especial ao Igor e à Stéphanie por todo auxílio, ajuda e companhia.

Ao David Sanín, pelo companheirismo imprescindível e por sempre me motivar, deixando essa jornada mais leve.

Aos meus pais, Luciano e Maria Inês, e à minha irmã Carolina, por todo incentivo, por acreditarem nas minhas escolhas e pelo apoio incondicional. Dedico este trabalho a vocês.

A todos minha gratidão, por terem colaborado, direta ou indiretamente, para a realização desta tese.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
INTRODUÇÃO GERAL	05
Objetivo geral	08
Estrutura da tese e objetivos específicos.....	08
Referências.....	09
CAPÍTULO I - Ontogenesis of ovary and fruit of <i>Acianthera johannensis</i> (Pleurothallidinae, Orchidaceae) reveals a particular female embryology.....	13
Abstract.....	14
Introduction.....	14
Materials and methods	15
Results.....	15
Discussion.....	19
References.....	20
CAPÍTULO II - Ocorrência de dois sítios de autoincompatibilidade em <i>Acianthera</i> (Pleurothallidinae, Orchidaceae)	22
Resumo	24
Introdução	25
Material e métodos.....	28
Resultados.....	30
Discussão	33
Referências.....	36
Figuras	41
CAPÍTULO III - Evidências de óvulos abortados após a reação de autoincompatibilidade no ovário em <i>Acianthera</i> (Pleurothallidinae, Orchidaceae).....	49
Resumo	51
Introdução	52
Material e métodos.....	55
Resultados.....	57
Discussão	60
Referências.....	63
Tabela.....	69

Figuras	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

RESUMO

Pleurothallidinae (Orchidaceae) compreende *ca.* 4.100 espécies, caracterizadas por flores tipicamente miiófilas e autoincompatíveis. Nas espécies dessa subtribo, a reação de autoincompatibilidade ocorre principalmente no canal estilar, onde o crescimento dos tubos polínicos é interrompido. No entanto, em algumas espécies de *Acianthera*, em que a autoincompatibilidade é parcial, foram observados tubos polínicos irregulares e anômalos chegando ao ovário e presentes no fruto. Os frutos que chegaram à maturidade após autopolinizações continham elevada taxa de sementes sem embrião. Diante disso, foi sugerido que um sistema de autoincompatibilidade (SI), distinto daquele que opera na coluna, estaria atuando também no ovário dessas espécies de *Acianthera* com autoincompatibilidade parcial. Diante desse cenário, nosso objetivo foi investigar se um segundo sítio de reação estaria atuando no ovário e se esse mecanismo estaria relacionado ao elevado número de estruturas sem embrião encontrado nos frutos resultantes de autopolinização em *Acianthera*. As espécies avaliadas foram *A. johannensis*, em que o SI atua parcialmente no ovário e, para se ter um referencial de uma espécie com SI forte, também analisamos *A. fabriobarrosii*. Os objetivos específicos deste estudo foram: caracterizar o desenvolvimento típico do ovário e fruto em *A. johannensis* após polinizações cruzadas (Capítulo I); investigar a ocorrência de reação de autoincompatibilidade no ovário em *A. johannensis*, e comparar com *A. fabriobarrosii* (Capítulo II); e por fim, verificar se as estruturas sem embrião encontradas em frutos provenientes de autopolinização em *A. johannensis* são óvulos não fecundados ou sementes abortadas (Capítulo III). Conduzimos experimentos de polinizações cruzadas e autopolinizações, análises de microscopia de luz, epifluorescência e eletrônica de transmissão. Nossos resultados evidenciaram a presença de dois sítios de reações de autoincompatibilidade em *A. johannensis*, sendo mais comumente a reação na coluna, tal como foi observado em *A. fabriobarrosii*. Características morfológicas e citológicas dos tubos polínicos obstruídos na coluna indicaram a presença de um sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI) nas duas espécies, sugerindo a presença de morte

celular programada nos tubos. Já o segundo sítio de reação ocorreu no ovário de alguns indivíduos semicompatíveis de *A. johannensis*. Os ovários resultantes de autopolinização em *A. johannensis* apresentaram menor proporção de óvulos fecundados quando comparados aos de polinização cruzada. No entanto, mais de 60% desses óvulos não fecundados estavam em processo de degeneração. De modo geral, nosso estudo demonstrou que a depressão endogâmica está associada ao elevado número de sementes sem embrião em frutos resultantes de autopolinizações em *A. johannensis* e que o GSI que atua no ovário está relacionado à maior proporção de óvulos não fecundados, devido à morte dos microgametófitos após a reação de autoincompatibilidade.

Palavras-chaves: depressão endogâmica, morte celular programada, óvulo degenerado, semente abortada, sistema de autoincompatibilidade gametofítico, ultraestrutura do tubo polínico.

ABSTRACT

Pleurothallidinae (Orchidaceae) with *ca.* 4.100 species, characterized by typically myophyllous and self-incompatible flowers. In the species of this subtribe, the self-incompatibility reaction occurs mainly in the stilar canal, where the growth of pollen tubes is interrupted. However, some species of *Acianthera* with partial self-incompatibility irregular and anomalous pollen tubes were observed reaching the ovary and in the fruit. The fruit that get maturity after self-pollination contained a high rate of seeds without embryos. Therefore, it has been suggested that a self-incompatibility system (SI), different from that operating in the column, would also be acting on the ovary of *Acianthera*'s species with partial self-incompatibility. In this scenario, our objective was to investigate if a second reaction site would be acting on the ovary and if this mechanism would be related to the high number of structures without embryos found in the fruit after self-pollination in *Acianthera*. The evaluated species were *A. johannensis*, in which SI acts partially on the ovary and, to have a reference for a species with strong SI, we also analyzed *A. fabriobarrosii*. The specific objectives of this study were: to characterize the typical development of the ovary and fruit in *A. johannensis* after cross-pollination (Chapter I); to investigate the occurrence of a self-incompatibility reaction in the ovary in *A. johannensis*, and compare with *A. fabriobarrosii* (Chapter II); and finally, to verify if structures without embryo found in fruits from self-pollination in *A. johannensis* are unfertilized ovules or aborted seeds (Chapter III). We conducted cross-pollination and self-pollination experiments, analysis of light microscopy, epifluorescence and transmission electronics. Our results evidenced the presence of two sites of self-incompatibility reactions in *A. johannensis*, most commonly observed the reaction in the column, as was observed in *A. fabriobarrosii*. Morphological and cytological characteristics of pollen tubes obstructed in the column indicated the presence of gametophytic self-incompatibility system (GSI) in both species, suggesting the presence of programmed cell death in the tubes. The second reaction site occurred in the ovary of some semicompatible individuals of *A. johannensis*. The ovaries resulting from self-pollination in *A. johanensis* presented low

proportion of fecundated ovules when compared with cross-pollination. However, more than 60% of unfertilized ovules were in the process of degeneration after self-pollination. Altogether, our study demonstrated that inbreeding depression is associated with the high number of seeds without embryos in fruit after self-pollination in *A. johannensis*, and that the GSI that acts on the ovary is related to a higher proportion of unfertilized ovule, due to the death of microgametophytes after the self-incompatibility reaction.

Keywords: aborted seed, degenerated ovule, gametophytic self-incompatibility system, inbreeding depression, pollen tube ultrastructure, programmed cell death.

INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae, uma das maiores famílias de angiospermas (*ca.* 20.000 espécies), apresenta alta diversidade na morfologia floral, a qual é altamente capaz de atrair diferentes polinizadores (van der Pijl & Dodsopn 1966; Dressler 1981, 1993; Catling & Catling 1991). Além disso, uma das características peculiares das orquídeas é a ocorrência do desenvolvimento dos óvulos somente após a polinização, uma vez que o ovário é rudimentar e a placenta não está diferenciada durante a antese (Swamy 1949; Clements 1999; Endress 2011; Kodahl *et al.* 2015), com raras exceções (Arekal & Karanth 1981; Wang *et al.* 2016). Após a polinização, o crescimento dos tubos polínicos no canal estilar induz a produção de auxina e etileno que estimulam a proliferação de células da placenta, diferenciação dos óvulos e desenvolvimento do pericarpo (Arditti 1979; Zhang & O'Neill 1993; Avadhani *et al.* 1994; Novak *et al.* 2014). Com isso, o período entre a polinização e o desenvolvimento das sementes pode ocorrer em um intervalo de tempo prolongado, o qual varia entre as espécies (Swamy 1949; Clements 1999; Mayer *et al.* 2011; Lee & Yeung 2012). Na subfamília Epidendroideae, por exemplo, o desenvolvimento de óvulos pode ocorrer entre 20 a 50 dias após a polinização, e a maturação do fruto pode levar até quatro meses (Stort 1972; Lee *et al.* 2008; Mayer *et al.* 2011).

Em relação ao sistema reprodutivo, as espécies de Orchidaceae são comumente autocompatíveis (Dressler 1981), entretanto a alogamia é comumente favorecida devido à presença de mecanismos que evitam a autopolinização, tais como barreiras morfológicas e comportamentais (Dressler 1981, 1993; Catling & Catling 1991; Borba & Semir 1999). No entanto, a depressão endogâmica é frequentemente registrada em casos de endogamia, em orquídeas autocompatíveis (Stort & Martins 1979; Borba & Braga 2003; Silva-Pereira *et al.* 2007; São Leão *et al.* 2019), levando ao aborto de zigotos e embriões devido à expressão de alelos recessivos deletérios em homozigose (Richards 1997). Embora a presença de barreiras pós-polinização, como o sistema de autoincompatibilidade (SI), seja menos frequente em Orchidaceae, este mecanismo tem sido relatado em espécies de Epidendroideae, sendo o sistema

reprodutivo predominante na subtribo Pleurothallidinae (Borba *et al.* 2001, 2011; Barbosa *et al.* 2009; Gontijo *et al.* 2010; Melo *et al.* 2011).

A subtribo Neotropical Pleurothallidinae (Epidendroideae) compreende aproximadamente 4.100 espécies, sendo caracterizadas por uma articulação entre o ovário e o pedicelo, e por flores tipicamente miiófilas (Luer 1986; Dressler 1981, 1993; Borba *et al.* 2011; Bogarín *et al.* 2018) e autoincompatíveis (Borba *et al.* 2011; Melo *et al.* 2011), exceto por um pequeno clado incluído em uma circunscrição expandida da subtribo (Pridgeon & Chase 2001). Embora o SI não tenha sido caracterizado geneticamente em nenhuma das espécies desta subtribo (ou mesmo na família), aspectos morfológicos e do desenvolvimento de grãos de pólen e tubos polínicos após autopolinizações foram utilizados para inferir o sistema de autoincompatibilidade atuando nessas espécies (Borba *et al.* 2001, 2011; Barbosa *et al.* 2009; Gontijo *et al.* 2010; Melo *et al.* 2011). Distintos sítios de ocorrência das reações de autoincompatibilidade foram indicados nas espécies de Pleurothallidinae: no estigma, com ausência de germinação dos grãos de pólen (similar ao observado no sistema de autoincompatibilidade esporofítico), no canal estilar, com morte dos tubos polínicos na coluna (similar ao sistema de autoincompatibilidade gametofítico) (Borba *et al.* 2011) e, raramente, no ovário (Borba *et al.* 2011; Millner *et al.*, 2015). Além disso, o sistema de autoincompatibilidade nesse grupo pode variar de completo a parcial, como observado em espécies de *Acianthera* (Borba *et al.* 2011).

O gênero *Acianthera* possui cerca de 200 espécies distribuídas por toda América do Sul (Pridgeon *et al.* 2005). Suas flores apresentam antese diurna e, frequentemente, odor desagradável, sendo polinizadas por espécies de Diptera (Borba & Semir 2001; Borba *et al.* 2011; Melo *et al.* 2011). Dentre as 11 espécies de *Acianthera* autoincompatíveis, cinco apresentaram autoincompatibilidade parcial, sendo registrada a média de 13% de frutificação após autopolinização (contra 44% em polinização cruzada) (Borba *et al.* 2001, 2011).

A reação de autoincompatibilidade em *Acianthera* ocorre comumente na coluna, onde os

tubos polínicos são interrompidos e apresentam morfologia anômala e irregular, elevada deposição de tampões de calose e intumescimento e rompimento do ápice, com liberação do citoplasma (Borba *et al.* 2001, 2011; Melo *et al.* 2011). Entretanto, em frutos maduros ou abortados provenientes de autopolinização em espécies com autoincompatibilidade parcial foi observado crescimento normal dos tubos polínicos ao longo da coluna, porém ao entrar no ovário eles tornavam-se irregulares e anômalos (Borba *et al.* 2001). Esses frutos apresentaram alta taxa de sementes sem embrião, comumente sugerida pela ação da depressão endogâmica (Borba *et al.* 2001, 2011).

Por outro lado, algum mecanismo de autoincompatibilidade que atua tardiamente no ovário poderia estar relacionado a esse baixo número de sementes com embrião, como sugerido por Borba *et al.* (2001). Conseqüentemente, as estruturas encontradas em frutos oriundos de autopolinização em *Acianthera* que não apresentam embrião desenvolvido poderiam ser apenas tegumentos de óvulos maduros que não foram fecundados, devido à morte dos microgametófitos. A distinção entre óvulos não fecundados e sementes abortadas pode ser de difícil detecção (Harder *et al.* 2012), uma vez que a diferenciação dos tegumentos de óvulos pode ser induzido pela ação de hormônios durante o desenvolvimento do fruto, como demonstrado experimentalmente para outras espécies de Orchidaceae (Arditti 1979; Avadhani *et al.* 1994) e de outras famílias (van Overbeek *et al.* 1941; Seavey *et al.* 2000).

Sendo assim, testamos a hipótese de que o elevado número de estruturas consideradas na literatura como sementes sem embrião em frutos após autopolinizações é devido à ocorrência de um sistema de autoincompatibilidade atuando tardiamente no ovário dessas espécies.

As predições relativas a esta hipótese são que:

(1) a presença de tubos polínicos irregulares e anômalos encontrados no ovário de algumas espécies de *Acianthera* após autopolinização é devida à reação tardia de um mecanismo de autoincompatibilidade;

(2) ocorre mais de um tipo de mecanismo de autoincompatibilidade nessas espécies;

(3) a morfologia dos tubos polínicos no ovário após autopolinização é diferente dos tubos polínicos que cessam o crescimento ainda no interior do canal estilar;

(4) as estruturas abortadas observadas em frutos de autopolinização são óvulos que não foram fecundados e não sementes abortadas;

(5) o desenvolvimento dos óvulos em flores autopolinizadas é diferente daqueles de flores em que houveram polinizações cruzadas.

Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de um sistema de autoincompatibilidade atuando no ovário e qual o seu papel no desenvolvimento dos frutos e sementes em *Acianthera*. Para isto investigamos *A. johannensis*, devido à presença da autoincompatibilidade parcial e maior frutificação em autopolinizações quando comparada com outras espécies (Borba *et al.* 2001, 2011). Além disso, analisamos os mesmos processos em *A. fabiobarrosii*, uma espécie com autoincompatibilidade forte (Borba *et al.* 2001, 2011), a fim de se ter um referencial do desenvolvimento típico dos tubos polínicos e desenvolvimento embrionário após polinizações experimentais.

Estrutura da tese e objetivos específicos

A tese está estruturada em três capítulos, os quais abordaram o objetivo geral e seus respectivos objetivos específicos. No primeiro capítulo caracterizamos o desenvolvimento dos óvulos e descrevemos o desenvolvimento do pericarpo e sementes em *Acianthera johannensis*, determinando o tempo entre a polinização e a formação da semente após polinizações cruzadas. No segundo capítulo investigamos a ocorrência de reação de autoincompatibilidade no ovário em flores autopolinizadas de *A. johannensis* e analisamos o desenvolvimento e a morfologia de tubos polínicos obstruídos na coluna e no ovário desta espécie, comparando com os tubos polínicos de *A. fabiobarrosii* após polinizações experimentais. No terceiro capítulo verificamos

se as estruturas consideradas sementes sem embrião de frutos resultantes de autopolinizações seriam óvulos não fecundados em *A. johannensis*, e avaliamos o sucesso de fecundação dos óvulos entre os tratamentos de polinizações. Além disso, analisamos o desenvolvimento do ovário e fruto após autopolinizações nesta espécie e comparamos aos de polinizações cruzadas de *A. fabriobarrosii*.

REFERÊNCIAS

- Arditti J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. *Advances in Botanical Research* 7: 421–655.
- Arekal GD, Karanth A. 1981. The embryology of *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 138: 1–7.
- Avadhani PN, Nair H, Arditti J, Hew CS. 1994. Physiology of orchid flower. In: Arditti J. ed. *Orchid biology, review and perspectives VI*. Wiley-Interscience, New York, USA, pp 189–362.
- Barbosa AR, Melo MC, Borba EL. 2009. Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution* 283: 1–8.
- Bogarín D, Fernández M, Borkent A, Heemskerk A, Pupulin F, Ramírez S, Smets E, Gravendeel B. 2018. Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 510–543.
- Borba EL, Semir J. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* 217: 197–204.
- Borba EL, Braga PIS. 2003. Reproductive biology of *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melittophily and self-compatibility in a basal Laeliinae. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 541–549.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 89–

- Borba EL, Semir J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: A multiple population approach. *Annals of Botany* 88: 75–88.
- Borba EL, Barbosa AR, Melo MC, Gontijo SL, Oliveira HO. 2011. Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): Evolutionary and systematic implications. *Lankesteriana* 11: 207–221.
- Catling PM, Catling VR. 1991. A synopsis of breeding systems and pollination in north american orchids. *Lindleyana* 6:187–210.
- Clements MA. 1999. Embryology. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. eds. *Genera Orchidacearum- General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Vol. I, Oxford University Press, Oxford, UK, pp 38–58.
- Dressler RL. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Dressler RL. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.
- Endress PK. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany* 107: 1465–1489.
- Gontijo SL, Barbosa AR, Melo MC, Borba EL. 2010. Occurrence of different sites of self-incompatibility reaction in four *Anathallis* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Species Biology* 25: 129–135.
- Harder LD, Hobbhahn N, Richards SA. 2012. How depressed? Estimates of inbreeding effects during seed development depend on reproductive conditions. *Evolution* 66: 1375–1386.
- Kodahl N, Johansen BB, Rasmussen FN. 2015. The embryo sac of *Vanilla imperialis* (Orchidaceae) is six-nucleate, and double fertilization and formation of endosperm are not observed. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 202–213.
- Lee YI, Yeung EC, Lee N, Chung MC. 2008. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: Embryo development. *Botanical Studies* 49: 139–146.

- Lee YI, Yeung EC. 2012. Embryology of the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*: Ovule development. *Botanical Studies* 53: 97–104.
- Luer CA. 1986. Icones Pleurothallidarum I. Systematics of Pleurothallidinae. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 15: 1–81.
- Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Appezzato-da-Glória B. 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Flora* 206: 601–609.
- Melo MC, Taucce PPG, Borba EL. 2011. Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 293: 161–176.
- Millner HJ, McCrea AR, Baldwin TC. 2015. An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. *American Journal of Botany* 102: 487–494.
- Novak SD, Luna LJ, Gamage RN. 2014. Role of auxin in orchid development. *Plant Signaling & Behavior* 9: 10 e972277.
- Pridgeon AM, Chase MW. 2001. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16: 235–271.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2005. Genera Orchidacearum, Epidendroideae (part one). Vol 4. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Richards AJ. 1997. Plant breeding systems. Chapman & Hall, London, UK.
- São Leão LC, Sá-Haiad B, Rodarte ATA, de Araujo Pimentel RR, Benevides CR, Santiago-Fernandes LDR, Lima HA. 2019. Reproductive biology of two synchronopatric neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *Flora* 251: 95–104.
- Seavey SR, Mangels SK, Chappel NJ. 2000. Unfertilized ovules of *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) continue to grow in developing fruits. *American Journal of Botany* 87: 1765–1768.
- Silva-Pereira V, Camargo E, Smidt E, Borba EL. 2007. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematic and Evolution* 269: 171–182.

- Stort MNS. 1972. Ovule development after pollination in *Eulophidium* Orchids. American Orchid Society Bulletin 23–28.
- Stort MNS, Martins PS. 1979. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). Ciência & Cultura 38: 1080–1083.
- Swamy BGL. 1949. Embryological studies in the Orchidaceae II. Embryogeny. The American Midland Naturalist 41: 202–232.
- van der Pijl L, Dodson CH. 1966. Orchid flowers: their pollination and evolution. University of Miami Press, Coral Gables, Florida, USA.
- van Overbeek J, Concklin ME, Blakelee AF. 1941. Chemical stimulation of ovule development and its possible relation to parthenogenesis. American Journal of Botany 28: 647–656.
- Wang LH, Tsay JS, Chi HS. 2016. Embryological studies on *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames. Flora 224: 191–202.
- Zhang XS, O'Neill SD. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. Plant Cell 5: 403–418.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora um sistema de autoincompatibilidade possa atuar tardiamente no ovário de *Acianthera johannensis*, esse mecanismo não está relacionado ao elevado número de estruturas consideradas sem embrião em frutos resultantes de autopolinização, como foi sugerido neste estudo. De acordo com as predições concluímos que:

(1) a presença de tubos polínicos irregulares e anômalos encontrados nos ovários/frutos de *A. johannensis* após autopolinizações é devida ao sistema de autoincompatibilidade que atua tardiamente no ovário;

(2) os sítios de reações de autoincompatibilidade na coluna e no ovário são governados pelo sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI);

(3) a morfologia dos tubos polínicos obstruídos no ovário é homóloga aos tubos polínicos que cessam o crescimento na coluna após autopolinização;

(4) as estruturas vazias em frutos desenvolvidos após autopolinização são sementes abortadas e não óvulos não fecundados, dada à ocorrência de fecundação em grande parte dos óvulos;

(5) o desenvolvimento dos óvulos em ovários após autopolinização é similar aos de polinização cruzada.

O registro de morte celular programada em tubos polínicos incompatíveis na coluna contribui para o entendimento da autoincompatibilidade em *Acianthera*. Além disso, acreditamos que a ocorrência do GSI no ovário também atua em outras espécies de Pleurothallidinae com autoincompatibilidade parcial.

Sugerimos que futuras investigações abordem tanto estudos morfológicos do tubo polínico quanto moleculares da reação de autoincompatibilidade em Pleurothallidinae, a fim de esclarecer se o mecanismo de reação do GSI nessas espécies é diferente do registrado em outras famílias.